

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 9/00</b>	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/58647</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. November 1999 (18.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03071		
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Mai 1999 (05.05.99)		
(30) Prioritätsdaten: 198 22 122.3 8. Mai 1998 (08.05.98) DE		
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).		
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): HÜLS, Christoph [DE/DE]; Rheinblick 19, D-55263 Wackernheim (DE). GALLERT, Karl-Christiaan [DE/DE]; Rendeler Strasse 91, D-61184 Karben (DE). KÖRNER, Christof [DE/DE]; Karolinen Strasse 3, D-80538 München (DE). WAHLE, Elmar [DE/DE]; An der Fels 20, D-35435 Wattenberg (DE).		
(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CZ, HU, JP, KR, NZ, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).		
<b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>		

**(54) Title:** HUMAN DEADENYLATING NUCLEASE, ITS PRODUCTION AND ITS USE**(54) Bezeichnung:** HUMANE DEADENYLIERENDE NUCLEASE, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG**(57) Abstract**

The invention relates to a nucleic acid coding for a human deadenylating nuclease (DAN) which has an amino acid sequence in accordance with SEQ 11 or one of its functional variants, and to parts thereof having at least 8 nucleotides.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft eine Nukleinsäure kodierend für eine humane deadenylierende Nuclease (DAN) mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden.

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasiliens	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Humane deadenylierende Nuclease, ihre Herstellung und Verwendung

### Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine humane deadenylierende Nuclease (DAN), ihre kodierende Nukleinsäure sowie ihre Herstellung und Verwendung.

Die intrazelluläre Konzentration von mRNA scheint nicht nur durch die Produktions-  
10 sondern auch durch die Abbaurate kontrolliert zu sein. Dabei scheinen mRNAs nicht durch ein zufälliges nukleolytisches Ereignis, sondern durch spezifische Mechanis-  
men und durch Abbauraten, die spezifisch für die jeweilige RNA sind, abgebaut zu  
werden. Zur Zeit sind zwei unterschiedliche Abbauwege bekannt, in denen die po-  
ly(A)-Schwänze eine besondere Rolle spielen. In E. coli werden poly(A)-Schwänze  
15 an mRNAs oder mRNA-Fragmente angehängt, die durch die RNase E generiert  
werden. Der poly(A)-Schwanz scheint als eine relativ unstrukturierte Einheit zu fun-  
gieren, die für die Anlagerung eines Komplexes verantwortlich ist, der neben ande-  
ren Proteinen eine prozessive 3'-Exonuclease, die eine Polynucleotid-Phos-  
phorylase darstellt, und eine RNA-abhängige ATPase enthält, welche der Exo-  
20 nuclease hilft, inhibierende Sekundärstrukturen in der mRNA zu umgehen. Ein ähn-  
licher Mechanismus scheint in Chloroplasten zu wirken.

In Eukaryonten leitet die exonukleolytische Verkürzung des poly(A)-Schwanzes  
ebenfalls den Abbau von vielen, aber nicht allen mRNAs ein. In Gegensatz zu dem  
25 Prozeß in Bakterien scheint die poly(A)-abbauende Exonuclease nicht in die 3'-UTR  
und die kodierende Sequenz in ihrem Abbau fortzuschreiten. Statt dessen scheint  
die eukaryotische Exonuclease nach Abbau des poly(A)-Schwanzes anzuhalten. Bei  
S. cerevisiae beinhaltet der zweite Schritt des mRNA-Abbaus die Entfernung der 5'-  
Cap-Struktur durch eine spezifische Pyrophosphatase. Allerdings findet die Entfer-  
30nung des CAPs erst nach einer Verkürzung des poly(A)-Schwanzes auf ca. 10-

15 Nukleotide statt. Die Entfernung der CAP-Struktur macht die mRNA für 5'-Exonuclease, deren wichtigster Vertreter durch das XRN1-Gen codiert wird, zugänglich.

- 5 Die Beobachtung des initialen Deadenylierungsprozesses in Säugetierzellen ist relativ einfach, während eine Untersuchung der weiteren Schritte durch die Schnelligkeit der nachfolgenden Abbauprozesse und das Fehlen von analysierbaren Zwischenprodukten erschwert wird. Indirekte Beweise sprechen aber dennoch für eine Entfernung der CAP-Struktur im zweiten Schritt. Ein Homolog aus der Maus ist für
- 10 das XRN1-Gen beschrieben worden. Im allgemeinen werden stabile mRNAs langsam und instabile mRNAs schnell deadenyliert. Der schnelle Abbau hängt von dem Vorkommen von bestimmten destabilisierenden Sequenzen in dem 3'-UTR oder in der codierenden Sequenz ab. Mutationen in diesen Sequenzen führen zudem nicht nur zu einer Stabilisierung der mRNA, sondern ebenfalls zu einer verlangsamten
- 15 Deadenylierung. Im Gegensatz dazu führt eine Inaktivierung eines stabilisierenden Elements der  $\alpha$ -Globulin mRNA zu einer Instabilität und zu einer beschleunigten Deadenylierung. Diese Daten sprechen eindeutig für eine Kontrolle des mRNA-Abbaus durch die Deadenylierungsrate.
- 20 Die Deadenylierung von bestimmten mRNAs kann ebenfalls zu einer Inaktivierung der Translation führen. Dies ist durch die Bedeutung des poly(A)-Schwanzes für die Initiation der Translation zu erklären. Die Deadenylierung als Translationskontrollmechanismus spielt bei der Reifung von Oozyten und der frühen Embryogenese in vielen tierischen Spezies eine entscheidende Rolle. Zum Beispiel wird bei Drosophila die Polarität des Embryos durch die Deadenylierung der sogenannten hunchback mRNA reguliert.

In Vertebraten können grundsätzlich drei Deadenylierungsreaktionen in der Oozytenreifung und frühen Embryogenese unterschieden werden:

- 30 1. In unreifen Oozyten werden die meisten mRNAs in einer translational inaktiven Form mit kurzen poly(A)-Schwänzen gespeichert. Ein Beispiel ist die mRNA für

tPA (tissue plasminogen activator) in der Maus. Zunächst erhält diese mRNA einen langen poly(A)-Schwanz in der normalen Polyadenylierungsreaktion, der dann durch Deadenylierung in einen Oligo(A)-Schwanz verkürzt wird. Diese Verkürzung wird durch Sequenzen im 3'-UTR gesteuert.

- 5     2. Bei der Reifung von Oozyten wird die Deadenylierung zur Inaktivierung bestimmter mRNAs verwendet, die ursprünglich lange poly(A)-Schwänze hatten und in der frühen Entwicklung aktiv waren. Die Deadenylierung ist nicht von spezifischen Sequenzen in der mRNA abhängig. Alle mRNAs werden deadenyliert, außer sie werden durch einen aktiven Adenylierungsprozess geschützt.
- 10    3. Während der frühen Embryogenese werden bestimmte mRNAs in einer spezifischen Reaktion deadenyliert, die ebenfalls spezifische Sequenzen im 3'-UTR benötigt.

Alle drei Deadenylierungsreaktionen finden im Cytoplasma statt. Allerdings bleiben 15 in Gegensatz zu somatischen Zellen die oligoadenylierten oder deadenylierten mRNAs in Oozyten stabil und werden erneut adenyliert oder erst in späteren Entwicklungsstadien abgebaut.

Bisher sind die für diese Reaktionen verantwortlichen Enzyme nicht eindeutig identifiziert worden. In der Hefe konnte gezeigt werden, daß der Abbau von poly(A) direkt oder indirekt vom poly(A) binding protein (PAB1) abhängt. Obwohl eine PAB1-abhängige Poly(A)nuclease (PAN) gereinigt worden ist (Sachs, A.B. & Deardorff 20 (1992) Cell, 70, 961; Lowell, J.E. et al. (1992) Genes Dev., 6, 2088), konnten bei Mutanten der betreffenden Gene (PAN2 und PAN3) nur geringe Defekte in der Deadenylierung festgestellt werden (Boeck, R. et al. (1996) 271 (1), 432; Brown, C. et al. (1996) 16 (10) 5744).

Körner, Ch.G. & Wahle, E. (1997) J. Biol. Chem., 272, 10448, No. 16 beschreiben eine Mg<sup>2+</sup>-abhängige poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuclease aus Kalbsthymus mit 30 einem Molekulargewicht von 74 kDa, die auch als deadenylierende Nuclease (DAN) bezeichnet wurde. Die beschriebene DAN aus Kalbsthymus wird durch das cytoplasmatische poly(A)-bindende Protein I (PAB I) unter bestimmten Reaktions-

bedingungen stimuliert (Körner, Chr. & Wahle, E. (1997), *supra*) und bevorzugt als Substrat Poly(A).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, eine humane Poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuclease bereitzustellen.

In einer Genbank wurde nun überraschenderweise ein nicht näher charakterisierter und nur ansequenziert Klon gefunden, der gemäß der vorliegenden Erfindung für eine humane deadenylierende Nuclease (humane DAN) kodiert.

10

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Nukleinsäure kodierend für eine humane DAN mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 15 oder 20 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 100 Nukleotiden, vor allem mit mindestens 300 Nukleotiden (nachfolgend „erfindungsgemäße Nukleinsäure“ genannt).

Die vollständige Nukleinsäure kodiert für ein Protein mit 639 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 73,5 kDa. Die Expression der Nukleinsäure in *E. coli* führte zu einem Protein, welches ähnliche enzymatische Aktivitäten wie die von Körner, Ch.G. & Wahle, E. (1997, *supra*) beschriebene DAN zeigt. Weitere Experimente gemäß der vorliegenden Erfindung bestätigten, daß es sich bei der Nukleinsäure um eine Nukleinsäure handelt, die für eine humane DAN kodiert. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure wurde am 25. März 1998 bei der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig unter der Nummer DSM 12075 hinterlegt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, und insbesondere eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ 12 von Pos. 58 bis Pos. 1977. Die beiden Positionen bestimmen gemäß der vorliegenden Erfindung den Start und das Ende des kodierenden Bereiches.

Unter dem Begriff „funktionelle Variante“ versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure, die funktionell mit der humanen DAN-kodierenden Nukleinsäure verwandt und insbesondere humanen Ursprungs ist. Beispiele verwandter Nukleinsäuren sind beispielsweise Nukleinsäuren aus unterschiedlichen humanen Zellen bzw. Geweben oder allelische Varianten. Die vorliegende Erfindung umfaßt ebenfalls Varianten von Nukleinsäuren, die von verschiedenen menschlichen Individuen stammen können.

Im weiteren Sinne versteht man unter dem Begriff „Varianten“ gemäß der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren, die eine Homologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 60%, vorzugsweise von ca. 75%, insbesondere von ca. 90% und vor allem von ca. 95% aufweisen.

Die Teile der erfindungsgemäßen Nukleinsäure können beispielsweise zur Herstellung einzelner Epitope, als Sonden zur Identifizierung weiterer funktioneller Varianten oder als Antisense-Nukleinsäuren verwendet werden. Beispielsweise eignet sich eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 8 Nukleotiden als Antisense-Nukleinsäure, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 15 Nukleotiden als Primer beim PCR-Verfahren, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 20 Nukleotiden für die Identifizierung weiterer Varianten und eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 100 Nukleotiden als Sonde.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine Poly(A)-Sequenz. Die nicht-kodierenden Sequenzen sind beispielsweise Intronsequenzen oder regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, zur kontrollierten Expression des humanen DAN kodierenden Gens.

In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure daher in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor enthalten.

Die Expressionsvektoren können beispielsweise prokaryotische oder eukaryotische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in E. coli z.B. der T7 Expressionsvektor pGM10 (Martin, 1996), welcher für einen N-terminalen Met-Ala-His6-Tag kodiert, der eine vorteilhafte Reihung des exprimierten Proteins über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule ermöglicht. Als eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* eignen sich z.B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767), für die Expression in Insektenzellen z.B. Baculovirus-Vektoren wie in EP-B1-0127839 oder EP-B1-0549721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z.B. SV40-Vektoren, welche allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die Wirtszelle geeignete regulatorische Sequenzen, wie z.B. den trp-Promotor für die Expression in E. coli (s. z.B. EP-B1-0154133), den ADH-2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2674), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (s. z.B. EP-B1-0127839) oder den frühen SV40-Promotor oder LTR-Promotoren z.B. von MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus; Lee et al. (1981) Nature, 214, 228).

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, vorzugsweise Adenovirusvektoren, insbesondere replikationsdefiziente Adenovirusvektoren,

oder Adenoassoziierte Virusvektoren, z.B. ein Adenoassozierter Virusvektor, der ausschließlich aus zwei insertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR) besteht.

25

Geeignete Adenovirusvektoren sind beispielsweise in McGrory, W.J. et al. (1988) Virol. 163, 614; Gluzman, Y. et al. (1982) in „Eukaryotic Viral Vectors“ (Gluzman, Y. ed.) 187, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Habor, New York; Chroboczek, J. et al. (1992) Virol. 186, 280; Karlsson, S. et al. (1986) EMBO J.. 5, 2377 oder

30 WO95/00655 beschrieben.

Geeignete Adeno-assoziierte Virusvektoren sind beispielsweise in Muzyczka, N. (1992) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158, 97; WO95/23867; Samulski, R.J. (1989) J. Virol, 63, 3822; WO95/23867; Chiorini, J.A. et al. (1995) Human Gene Therapy 6, 1531 oder Kotin, R.M. (1994) Human Gene Therapy 5, 793 beschrieben.

5 Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert. Hierzu eignen sich Lipidmischungen wie bei Felgner, P.L. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci, USA 84, 7413; Behr, J.P. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982; Felgner, J.H. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 2550 oder Gao, X. & Huang, L. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1189, 195 beschrieben. Bei der Herstellung der Liposomen wird die DNA ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die DNA vollständig von den Liposomen komplexiert wird.

10 15 Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann beispielsweise chemisch anhand der in SEQ 12 offenbarten Sequenz oder anhand der in SEQ 11 offenbarten Peptidsequenz unter Heranziehen des genetischen Codes z.B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (s. z.B. Uhlman, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543, No. 4). Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäße Nuklein-säure in die Hand zu bekommen, ist die Isolierung aus einer geeigneten Genbank, beispielsweise aus einer humanen Genbank, anhand einer geeigneten Sonde (s. z.B. Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York). Als Sonde eignen sich beispielsweise einzelsträn-20 gige DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100 bis 1000 Nucleotiden, vorzugs-weise mit einer Länge von ca. 200 bis 500 Nucleotiden, insbesondere mit einer 25 Länge von ca. 300 bis 400 Nucleotiden, deren Sequenz aus der Nukleinsäurese-quenz gemäß SEQ 12 abgeleitet werden kann.

30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch das Polypeptid selbst mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 oder einer funktionellen Variante da-von, und Teile davon mit mindestens sechs Aminosäuren, vorzugsweise mit minde-

stens 12 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 65 Aminosäuren und vor allem mit 638 Aminosäuren (nachfolgend „erfindungsgemäßes Polypeptid“ genannt). Beispielsweise kann ein ca. 6-12, vorzugsweise ca. 8 Aminosäuren-langes Polypeptid ein Epitop enthalten, das nach Kopplung an einen Träger zur Herstellung von spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper dient (siehe hierzu z. B. US 5,656,435). Polypeptide mit einer Länge von mindestens ca. 65 Aminosäuren können auch direkt ohne Träger zur Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörper dienen.

- 10 Unter dem Begriff „funktionelle Variante“ im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man Polypeptide, die funktionell mit dem erfindungsgemäßen Peptid verwandt sind, d.h. eine Poly(A)-spezifische 3'-Exoribonucleaseaktivität aufweisen und vorzugsweise unter zwei verschiedenen Reaktionsbedingungen aktiv sind. Bei der ersten Reaktionsbedingung ist in Abwesenheit von Salz die Aktivität vollständig von 15 der Anwesenheit von Spermidin abhängig. Im Gegensatz hierzu ist in Abwesenheit von Spermidin die Aktivität des Enzyms von der Salzkonzentration abhängig. Zudem kann in Anwesenheit von PAB1 unter bestimmten Reaktionsbedingungen ein stufenweiser Abbau des Poly(A)-Schwanzes beobachtet werden (siehe auch Körner, Chr. G. & Wahle, E. (1997), *supra*). Insbesondere unterscheiden sich die vorherrschenden Abbauprodukte in ihrer Länge um ca. 30 Nukleotide. Unter Varianten versteht man auch allelische Varianten oder Polypeptide, die von anderen menschlichen Zellen bzw. Gewebe abstammen. Auch versteht man darunter Polypeptide, die von verschiedenen menschlichen Individuen stammen.
- 20 Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 70%, vorzugsweise von ca. 80%, insbesondere von ca. 90%, vor allem von ca. 95% zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 haben. Ferner zählen hierzu auch Deletion des Polypeptids im Bereich von ca. 1 - 60, vorzugsweise von ca. 1 - 30, insbesondere von ca. 1 - 15, vor allem von ca. 1 - 5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird. Daneben zählen hierzu auch Fusionsproteine, die die oben be-
- 25
- 30

schriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die Fusionsproteine selbst bereits die Funktion einer humanen DAN haben oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion bekommen können. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von insbesondere nicht-humanen Sequenzen von ca. 1 - 200, vorzugsweise ca. 1 - 150, insbesondere ca. 1 - 100, vor allem ca. 1 - 50 Aminosäuren. Beispiele von nicht-humanen Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, z.B. aus der Galactosidase von E. coli oder ein sogenannter Histidin-Tag, z.B. ein Met-Ala-His<sub>6</sub>-Tag. Ein Fusionsprotein mit einem sogenannten Histidin-Tag eignet sich besonders vorteilhaft zur Reinigung des exprimierten Proteins über Metallionen-haltige Säulen, beispielsweise über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule. „NTA“ steht für den Chelator „nitrilotriacetic acid“ (Qiagen GmbH, Hilden).

Die Teile des erfindungsgemäßen Polypeptids repräsentieren beispielsweise Epitope, die spezifisch von Antikörpern erkannt werden können.

Durch Vergleich mit bekannten Nucleasen wurde gefunden, daß das erfindungsgemäße Polypeptid ein Mitglied der sogenannten RNaseD-Familie ist. Figur 4 zeigt die konservierten Aminosäuren der Exo I, Exo II und Exo III Motive, die für diese Klasse von Exonucleasen charakteristisch sind. Andere konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Die drei sauren Aminosäureseitenketten, zwei in der Exo I Domäne und eine in der Exo III Domäne, sind direkt in der Bindung der zwei Mg<sup>2+</sup>-Ionen, die an der enzymatischen Hydrolyse beteiligt sind, involviert. Eine dritte saure Aminosäureseitenkette, die in der Exo II Domäne lokalisiert ist, bindet eines der Metallionen über Wasserbrückenmoleküle. All diese Aminosäurereste sind innerhalb der Familie hoch konserviert und werden auch in der erfindungsgemäßen humanen DAN gefunden. Das erfindungsgemäße Polypeptid kann daher als eine Poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuclease der RNaseD Familie bezeichnet werden.

Das erfindungsgemäße Polypeptid wird beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden herge-

stellt. Als Wirtszellen eignen sich beispielsweise die *E. coli* Stämme DH5, HB101 oder BL21, der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, die Insektenzelllinie Lepidopteran, z.B. von *Spodoptera Frugiperda*, oder tierische Zellen wie COS, Vero, 293 und HeLa, die alle allgemein erhältlich sind.

5

Insbesondere die genannten Teile des Polypeptids können auch mit Hilfe der klassischen Peptidsynthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Sie eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antiseren, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten 10 des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher auf ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und gegebenenfalls isoliert wird.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf Antikörper, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid spezifisch reagieren, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch 20 Koppelung an geeignete Träger, wie z.B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können.

Die Antikörper sind entweder polyklonal oder monoklonal. Die Herstellung, die auch einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt, erfolgt beispielsweise nach 25 allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon, gegebenenfalls in Anwesenheit von z.B. Freund's Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (s. z.B. Diamond, B.A. et al. (1981) *The New England Journal of Medicine*, 1344). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion 30 entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z.B. über Säulenchromatographie reinigen. Bevorzugt wird eine Affinitätsreinigung der Antikörper, bei der bei-

spielsweise das C-terminale DAN-Fragment an eine NHS-aktivierte HiTrap-Säule gekoppelt wurde.

Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von  
5 Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293) hergestellt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Arzneimittel, das  
eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid und  
10 gegebenenfalls geeignete Zusatz- oder Hilfsstoffe enthält und ein Verfahren zur  
Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs, Autoimmunkrankheiten,  
insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit,  
Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Ar-  
throse, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten  
15 und/oder Diabetis und /oder zur Beeinflussung des Zellmetabolismus, insbesondere  
bei der Immunsuppression, vor allem bei Transplantationen, bei dem eine erfin-  
dungsgemäße Nukleinsäure, beispielsweise eine sogenannten Antisense-  
Nukleinsäure, oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit pharmazeutisch an-  
nehmbaren Zusatz- und/oder Hilfsstoffen formuliert wird.

20 Für die gentherapeutische Anwendung beim Menschen ist vor allem ein Arzneimittel  
geeignet, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure in nackter Form oder in Form  
eines der oben beschriebenen gentherapeutisch wirksamen Vektoren oder in mit  
Liposomen komplexierter Form enthält.

25 Als geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe eignen sich z.B. eine physiologische  
Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinaseinhibitoren, Nukleaseinhibitoren etc.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Diagnostikum ent-  
30 haltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid  
oder erfindungsgemäße Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder  
Hilfsstoffe und ein Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von

Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und /oder Diabetis und/oder zur Analyse des Zellmetabolismus, insbesondere des Immunstatus, vor allem bei Transplantationen, bei dem eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder erfindungsgemäße Antikörper mit geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen versetzt werden.

- 10 Beispielsweise können gemäß der vorliegenden Erfindung anhand der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ein Diagnostikum auf der Basis der Polymerasekettenreaktion (PCR-Diagnostik, z.B. gemäß EP-0200362) oder eines Northern Blots, wie in Beispiel 5 näher beschrieben, hergestellt werden. Diese Tests beruhen auf der spezifischen Hybridisierung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit dem komplementären Gegenstrang üblicherweise der entsprechenden mRNA. Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann hierbei auch modifiziert sein, wie z.B. in EP0063879 beschrieben. Vorzugsweise wird ein erfindungsgemäßes DNA-Fragment mittels geeigneter Reagenzien, z.B. radioaktiv mit  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dATP oder nicht-radioaktiv mit Biotin, nach allgemein bekannten Methoden markiert und mit isolierter RNA, die vorzugsweise an geeignete Membranen aus z.B. Zellulose oder Nylon gebunden wurde, inkubiert. Zudem ist es vorteilhaft, die isolierte RNA vor der Hybridisierung und Bindung an eine Membran der Größe nach, z.B. mittels Agarose-Gelelektrophorese, aufzutrennen. Bei gleicher Menge an untersuchter RNA aus jeder Gewebeprobe kann somit die Menge an mRNA bestimmt werden, die spezifisch durch die Sonde markiert wurde.

Ein weiteres Diagnostikum enthält das erfindungsgemäße Polypeptid bzw. die oben näher beschriebenen immunogenen Teile davon. Das Polypeptid bzw. Teile davon, die vorzugsweise an eine Festphase, z.B. aus Nitrocellulose oder Nylon, gebunden sind, können beispielsweise mit der zu untersuchenden Körperflüssigkeit z.B. Blut, in vitro in Berührung gebracht werden, um so beispielsweise mit Autoimmunantikör-

per reagieren zu können. Der Antikörper-Peptid-Komplex kann anschließend beispielsweise anhand markierter Antihuman-IgG- oder Antihuman-IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Bei der Markierung handelt es sich beispielsweise um ein Enzym, wie Peroxidase, das eine Farbreaktion katalysiert. Die Anwesenheit und die s Menge an anwesenden Autoimmunantikörpern kann somit über die Farbreaktion leicht und schnell nachgewiesen werden.

Ein anderes Diagnostikum enthält die erfindungsgemäßen Antikörper selbst. Mit Hilfe dieser Antikörper kann beispielsweise eine Gewebeprobe des Menschen leicht 10 und schnell dahingehend untersucht werden, ob das betreffende Polypeptid vorhanden ist. In diesem Fall sind die erfindungsgemäßen Antikörper beispielsweise mit einem Enzym, wie oben bereits beschrieben, markiert. Der spezifische Antikörper-Peptid-Komplex kann dadurch leicht und ebenso schnell über eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden.

15 Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft auch einen Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren, wie z.B. Inhibitoren oder Stimulatoren, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder die erfindungsgemäßen Antikörper und gegebenenfalls geeignete Zusatz- 20 und/oder Hilfsstoffe.

Ein geeigneter Test zur Identifizierung funktioneller Interaktoren ist z.B. das sogenannte „Two-Hybrid System“ (Fields, S. & Sternglanz, R. (1994) Trends in Genetics, 10, 286). Bei diesem Test wird eine Zelle, beispielsweise eine Hefezelle, mit einem 25 oder mehreren Expressionsvektoren transformiert oder transfiziert, die ein Fusionsprotein exprimieren, das das erfindungsgemäße Polypeptid und eine DNABindedomäne eines bekannten Proteins, beispielsweise von Gal4 oder LexA aus E. coli, enthält und/oder ein Fusionsprotein exprimieren, das ein unbekanntes Polypeptid und eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne, beispielsweise von Gal4, Herpesvirus VP16 oder B42, enthält. Zudem enthält die Zelle ein Reportergen, beispielsweise das LacZ-Gen aus E. coli, „Green Fluorescence Protein“ oder die Aminosäure-Biosynthesegene der Hefe His3 oder Leu2, das durch regulatorische Se- 30

quenzen, wie z.B. den LexA-Promotor/Operator oder durch eine sogenannte „Upstream Activation Sequence“ (UAS) der Hefe kontrolliert wird. Das unbekannte Polypeptid wird beispielsweise durch ein DNA-Fragment kodiert, das aus einer Genbank, beispielsweise aus einer humanen Genbank, stammt. Üblicherweise wird 5 gleich eine cDNA-Genbank mit Hilfe der beschriebenen Expressionsvektoren in Hefe hergestellt, so daß der Test unmittelbar danach durchgeführt werden kann.

- Beispielsweise wird in einem Hefe-Expressionsvektor die erfindungsgemäße Nukleinsäure in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die LexA-DNA-Bindedomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid und der LexA-DNA-Bindedomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. In einem anderen Hefe-Expressionsvektor werden cDNA-Fragmente aus einer cDNA-Genbank in funktioneller Einheit an die Nukleinsäure kodierend für die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne kloniert, so daß ein Fusionsprotein aus einem unbekannten Polypeptid und der Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne in der transformierten Hefe exprimiert wird. Die mit beiden Expressionsvektoren transformierte Hefe, die beispielsweise Leu2<sup>-</sup> ist, enthält zusätzlich eine Nukleinsäure, die für Leu2 kodiert, und durch den LexA-Promotor/Operator kontrolliert wird. Im Falle einer funktionellen Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und dem unbekannten Polypeptid bindet die Gal4-Transkriptions-Aktivierungsdomäne über die LexA-DNA-Bindedomäne an den LexA-Promotor/Operator, wodurch dieser aktiviert und das Leu2-Gen exprimiert wird. Dies hat zur Folge, daß die Leu2<sup>-</sup> Hefe auf Minimalmedium, das kein Leucin enthält, wachsen kann.
- Bei Verwendung des LacZ- bzw. „Green Fluorescence Protein“-Reportergens anstelle eines Aminosäure-Biosynthesegens kann die Aktivierung der Transkription dadurch nachgewiesen werden, daß sich blau- bzw. grün-fluoreszierende Kolonien bilden. Die Blau- bzw. Fluoreszenzfärbung läßt sich aber auch leicht im Spectrophotometer z.B. bei 585 nm im Falle einer Blaufärbung quantifizieren.

Auf diese Weise können Expressionsgenbanken leicht und schnell auf Polypeptide durchsucht werden, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid interagieren. An-

schließend können die gefundenen neuen Polypeptide isoliert und weiter charakterisiert werden.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des „Two-Hybrid-Systems“ ist die Beeinflussung der Interaktion zwischen dem erfindungsgemäßen Polypeptid und einem bekannten oder unbekannten Polypeptid durch weitere Substanzen, wie z.B. chemische Verbindungen. Auf diese Weise lassen sich auch leicht neue wertvolle chemisch synthetisierbare Wirkstoffe auffinden, die als Therapeutikum eingesetzt werden können. Die vorliegende Erfindung ist daher nicht nur auf ein Verfahren zum Auffinden von polypeptidartigen Interaktoren bestimmt, sondern erstreckt sich auch auf ein Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die mit dem oben beschriebenen Protein-Protein-Komplex interagieren können. Derartige peptidartige, wie auch chemische Interaktoren werden daher im Sinne der vorliegenden Erfindung als funktionelle Interaktoren bezeichnet, die eine inhibierende oder eine stimulierende Wirkung haben können.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des erfindungsgemäßen Polypeptids ist der Poly(A)-spezifische Abbau von Nukleinsäuren, insbesondere von mRNA. Der Poly(A)-spezifische Abbau von Nukleinsäuren kann insbesondere in Forschungslabors Verwendung finden.

Die nachfolgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

25

#### Beschreibung der Figuren und den wichtigsten Sequenzen

SEQ 11 zeigt die Aminosäuresequenz der humanen DAN mit Domänen für Exo I (ADFFAIDGEFSGIS), Exo II LVIGHNMLLDVMHTVH) und Exo III (SEQLHEAGYDAYITGLC).

SEQ 12 zeigt die Nukleinsäuresequenz der humanen DAN einschließlich Start-(Pos. 58) und Stoppkodon (Pos. 1977) mit anschließender 3'UTR.

- Fig. 1 zeigt das Elutionsprofil der humanen DAN an MonoQ (Fig. 3A) und SDS-PAGEs (Fig. 1B und 1C)
- Fig. 2 zeigt einen Western-Blot von rekombinanter humaner DAN und nativer boviner DAN
- Fig. 3 zeigt die Deadenylierung von mRNA, die Akkumulierung von deadenylierter RNA und den Einfluß von PABI
- Fig. 4 zeigt einen Vergleich bekannter Nucleasen mit der erfindungsgemäßen humanen DAN.

### Beispiele

15 1. Identifizierung von humanen DAN cDNA-Klonen

Die Reinigung von boviner DAN wurde, wie bei Körner, G. & Wahle, E. (1997), supra, beschrieben, wie folgt durchgeführt:

Alle Schritte der Reinigung wurden bei 4°C durchgeführt. Zwischen den Reinigungsstufen wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C eingefroren. Folgender Basispuffer wurde benutzt: 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM Dithiothreitol, 0,4 µg/ml Leupeptinhemisulfat, 0,7 µg/ml Pepstatin, 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,02 % (v/v) Nonidet P-40, pH 7,9. Bei den verschiedenen Reinigungsstufen wurden diesem Basispuffer unterschiedliche Konzentrationen KCl wie unten beschrieben zugesetzt.

Frischer Kalbsthymus wurde von einem örtlichen Schlachthaus bezogen, auf Eis transportiert und bei -80°C gelagert. Ein kg wurde in 2 l Basispuffer mit 50 mM KCl aufgetaut und in einem Waring Blender Homogenizator zunächst mit kleiner, dann mit mittlerer und schließlich mit höchster Geschwindigkeit homogenisiert. Das Ho-

mogenisat wurde 1 h bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand durch eine weitmaschige Gaze dekantiert (Wahle, E., J. Biol. Chem., 266, 1991).

- Dieser Extrakt aus Kalbsthymus wurde auf eine DEAE-Sepharose FF Säule (Säulenvolumen 4 l) aufgetragen und mit einem Salzgradienten über das 2,5-fache Säulenvolumen von 50 bis 600 mM KCl von der Säule mit einer Flußrate von 3 l/h eluiert. Aktive Fraktionen wurden bei einer Salzkonzentration zwischen 75 und 200 mM KCl von der Säule eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt, mit Ammoniumsulfat bis zu einer 30% gesättigten Lösung versetzt und für 1,5 h auf Eis gerührt. Nach einer Zentrifugation (30 min, 10800 x g, gilt für alle unten erwähnten Zentrifugationsschritte) wurde der Überstand auf 50 %-ige Sättigung mit Ammoniumsulfat eingestellt, erneut auf Eis gerührt und zentrifugiert. Das Sediment wurde in 400 ml Basispuffer mit 50 mM KCl resuspendiert und für 10 h gegen 2 x 4,5 l Basispuffer dialysiert und erneut zentrifugiert. Eine 1,4 l Sepharose-Blue Säule (7 x 36 cm) wurde mit Basispuffer mit 50 mM KCl äquilibriert und der dialysierte Extrakt auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 1,5 Bettvolumina von Basispuffer mit 250 mM KCl gewaschen und mit einem Bettvolumen Basispuffer mit 1 M KCl eluiert (Flußgeschwindigkeit 2 l/h).
- Die aktiven Fraktionen von zwei Präparationen aus jeweils 1,2 kg Kalbsthymus wurden zusammengeführt und mit Ammoniumsulfat (60% Sättigung) gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment in 200 ml Basispuffer mit 50 mM KCl aufgenommen, 12 h gegen 3 x 4 l des selben Puffers dialysiert und in zwei Portionen auf eine Heparin-Sepharose Säule (2,5 x 37 cm) aufgetragen. Die Säule wurden mit 1,5 Bettvolumina Basispuffer mit 50 mM KCl gewaschen und anschließend mit 10 Bettvolumina in einem Gradienten bis 500 mM KCl (Flußgeschwindigkeit: 145 ml/h) eluiert. Die DAN Aktivität eluierte zwischen 80 und 150 mM KCl. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und gegen Basispuffer mit 30 mM KCl für 4 h dialysiert. Das Dialysat wurde abzentrifugiert und in zwei Portionen an einer MonoQ FPLC Säule chromatographiert (Bettvolumen 8 ml). Die Säule wurde mit zwei Bettvolumen Basispuffer mit 50 mM KCl gewaschen und anschließend mit einem Gradienten über 320 ml mit einer steigenden Salzkonzentration (Endkonzentration: 500 mM KCl,

- Flußgeschwindigkeit: 2,5 ml/h) von der Säule eluiert. Die DAN-Aktivität eluierte bei ca. 160 mM KCl. Die aktiven Fraktionen (40 ml) wurden vereinigt und für 4 h gegen 2 l Basispuffer mit 30 mM KCl dialysiert, zentrifugiert und auf eine weitere MonoQ-Säule (1 ml Bettvolumen, Flußgeschwindigkeit: 0,9 ml/h) aufgetragen. Die an die 5 Säule gebundene DAN-Aktivität wurde mit Basispuffer mit 500 mM KCl eluiert und in vier Portionen auf eine Superdex HR 10/30 FPLC Säule (äquilibriert mit Basispuffer mit 300 mM KCl, Flußgeschwindigkeit: 0,15 ml/h) aufgetragen (Körner, Ch. G. & Wahle, E. (1997), *supra*)
- 10 Verschiedene Fraktionen einer Superdex-Säule, die die DAN Aktivität enthielten, wurden gesammelt und über eine Phenyl-Superose-Säule getrennt (Körner, G. & Wahle, E. (1997), *supra*). Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und gegen Puffer (50 mM Tris HCl, pH 7,9, 1mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, 1 mM Dithiothreitol, 0,4 µg/ml Leupeptin-Hemisulfat, 0,7 µg/ml Pepstatin, 0,5 mM Phenylmethylsulfonat 15 (PMSF), 0,02 % (v/v) Nonidet p-40, 50 mM KCl) dialysiert. Nach Zentrifugation wurde das Dialysat an einer 100 µl Smart MonoQ (PC 1.6/5) Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 200 µl Puffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden in einem Gradienten mit einer steigenden Salzkonzentration (Endkonzentration 500 mM KCl) über ein Volumen von 40 Säulenbettvolumina eluiert. Die Fraktionen, die 20 positiv für die DAN-Aktivität waren, eluierten bei einer KCl-Konzentration von ca. 200 mM KCl. Die zwei Fraktionen mit der höchsten DAN-Aktivität wurden mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Anschließend folgte eine *in situ* Hydrolyse durch die Protease Lys-C, die Auftrennung über HPLC und Sequenzierung der Peptide. Folgende Sequenzen wurden gefunden:
- 25 1. KSFNFYVFPK,  
2. KPFNRSSPD(V/K)K,  
3. KYAESYWIQTYADYVG sowie  
4. eine Mischung aus: KEQEELNDA und KLFLMRVMD.
- Die N-terminale Sequenz der gereinigten bovinen DAN konnte nicht bestimmt werden.  
30

Anschließend wurden EST (expressed sequence tags)-Datenbankrecherchen mit Hilfe des BLAST-Programms (NCBI) durchgeführt. Folgende Klone konnten identifiziert werden:

- I.M.A.G.E.-Konsortium Klon ID 645295 durch Peptide 1 und 2 und  
I.M.A.G.E.-Konsortium Klon ID 301901 durch Peptid 3.

Das vollständige Sequenzieren der gefundenen Klone wurde auf einem ABI373A-Sequenzergerät mit dem ABI Dye Terminator Cycle SequencingKit durchgeführt.

- Hierbei wurde gefunden, daß der I.M.A.G.E.-Konsortium Klon ID 301901 für die 176 C-terminalen Aminosäuren von DAN und den gesamten 3'-UTR kodiert, während I.M.A.G.E.-Konsortium Klon ID 645295 den gesamten ORF und den 5'UTR und einen Teil des 3'-UTR kodiert, was einem Protein von 639 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 73,5 kDa entspricht (SEQ 11). Die 57 Nukleotide, die stromaufwärts vom ersten AUG Codon liegen enthalten kein Stop-Codon im Leseraster. Die dieses AUG-Codon umgebenden Sequenzen (AGAAUUGG) entsprechen den sogenannten Kozak-Regeln (Kozak, 1991), die für den Translationsstart bevorzugte Startsequenzen beschreiben. Ein 3'-UTR von 0,7 kB ist im cDNA-Klon 645 295 und ein poly(A)-Schwanz ist am Ende des cDNA-Klons 301901 zu finden. Dem poly(A)-Schwanz geht stromaufwärts das seltene Polyadenylierungssignal AUUAAA voraus. (SEQ 12)

## 2. Herstellung von Expressionsvektoren

- Das Plasmid pGMMCS wurde auf folgende Weise konstruiert:

Der T7 Expressionsvektor pGM10 (Martin, 1996), welcher die PABII cDNA-Sequenz (Nemeth, 1996) mit einem N-terminalen Met-Ala-His<sub>6</sub>-Tag enthielt, wurde mit Xho I und BamH I verdaut und das Fragment, das den 3'-Teil des PAB II enthielt, wurde durch ein Xho I/BamH I-Fragment aus der Multiple Cloning Site vom pBluescript KS (+/-) Plasmid ersetzt. Das resultierende Plasmid enthält eine durch den T7-Promotor kontrollierte Sequenz, die mit Met-AlaHis<sub>6</sub> beginnt und durch den 5'-Teil vom PAB II

und einer Multi Cloning Site gefolgt wird. Eine Nde I Schnittstelle liegt zwischen dem His<sub>6</sub>-Tag und der PAB II Sequenz und kann zusammen mit der Multi Cloning Site dafür benutzt werden, um die verbliebene PAB II Sequenz durch jede beliebige kodierende Sequenz zu ersetzen.

- 5 Das Plasmid pGMMCS301901 wurde auf folgende Weise hergestellt:

Ein Teil der Sequenz des humanen DAN-Klons, der die 176 C-terminalen Aminosäuren enthielt wurde mittels PCR aus dem Klon 301901 mit folgenden Bedingungen amplifiziert:

- 10 15 Zyklen: 45 s bei 94°C, 45 s bei 54°C und 3,5 min bei 72°C. Pfu-Polymerase und die Primer Nde I301901: CCATATCCATATGCTTTCACTGCCTTCCTAAC und Xho I 301901: AGTACTCGAGTTACAATGTGTCAGG. Nach Verdau mit Nde I und Xho I wurden die entstandenen cDNA-Fragmente mit dem Qia-Ex-Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gereinigt und in den Nde I und Xho I verdauten pGMMCS-Vektor 15 integriert. Die Sequenz wurde mit Hilfe von Sequenzierung bestätigt.

Das Plasmid pGMMCS645295 wurde wie folgt hergestellt:

- Die kodierende Sequenz des humanen DAN-Klons wurde mittels PCR aus dem Klon 20 645295 mit folgenden Bedingungen amplifiziert:  
20 Zyklen: 45 s bei 94°C, 45 s bei 54°C und 3,5 min bei 72°C. Pfu-Polymerase und die Primer Nde I645295: AGTGTGCGCATATGGAGATAATCAGGAGCA und Xho I 645295: AGTACTCAGCGGTTGCTGCCCTCA. Das entstandenen Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 mit Hilfe des TA-Klonierungs-Kits (InVitrogen ®) kloniert.  
25 Nach Verdau mit Nde I und Xho I wurden die entstandenen cDNA-Fragmente mit dem Qia-Ex-Kit (Qiagen) gereinigt und in den Nde I und Xho I verdauten pGMMCS-Vektor integriert. Anschließend wurde der größte Teil der durch PCR generierten Sequenz mit Hilfe eines Verdaus mit Dra III und BstE II entfernt und durch das entsprechende Fragment des Originalklons ersetzt. Die neue Sequenz wurde mit Hilfe 30 von Sequenzierung bestätigt.

### 3. Herstellung von Antikörpern

Antikörper gegen den C-terminalen Teil von humanem DAN wurden wie folgt produziert:

- Das Plasmid pGMMCS301901 wurde in BL21 (pLysC) transformiert. Die Zellen wurden bei 37°C in SOB-Medium mit 200 µg/ml Carbenicillin bis zu einer OD600 von 1,9 inkubiert. Anschließend wurde 200 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactosid dazugegeben und für weitere 5 h inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und in Puffer A (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris, 8M Harnstoff, pH 7,9) aufgenommen. Die Zellen wurden mit Ultraschall lysiert, das Lysat zentrifugiert und mit 3 ml Ni-NTA-Säulenmaterial für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Säulenmaterial wurde in eine Säule gepackt und mit 70 ml Puffer A, pH 6,3 gewaschen. Anschließend wurde mit 15 ml Puffer B (300 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 50 mM Tris, 0,01 % (v/v) Nonidet-P40, 8M Harnstoff, pH 7,9) gewaschen. Das Protein wurde auf der Säule zurückgefaltet, indem mit zwei Gradienten der Harnstoffgehalt verringert wurde (45 ml/h, Gradient 1: Puffer B von 8 auf 4 M Harnstoff bei Raumtemperatur, Gradient 2: von 4 auf 0 M Harnstoff bei 4°C). Das Protein wurde mit Puffer B, der 500 mM Imidazole enthielt, von der Säule eluiert, gegen Puffer B ohne Harnstoff dialysiert und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet.

20

- Die Affinitätsreinigung von Anti-DAN-Antikörper wurde wie folgt vorgenommen: Das C-terminale DAN-Fragment wurde an eine NHS-aktivierte HiTrap-Säule (1 ml Volumen, Pharmacia, Freiburg) nach Herstelleranweisungen gekoppelt. 3 ml Serum wurden auf die Säule aufgetragen und nach Herstellerangaben eluiert. 300 µg/ml BSA und 0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub> wurden den Fraktionen zugesetzt und der Puffer wurde mittels Dialyse ausgetauscht.

### 4. Expression und Reinigung von humaner DAN

- Humane DAN wurde in E. coli als Fusionsprotein mit N-terminalem His-Tag (Met-Ala-His<sub>6</sub>-Tag) folgendermaßen exprimiert:

Das Plasmid pGMMCS645295 wurde in BL21 (pLysC) transformiert. Die Zellen wurden in 50 ml LB Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin und 24 µg/ml Chloramphenicol bei 37°C angezogen und anschließend in eine 500 ml Kultur ohne Chloramphenicol überführt und bei 33°C weiterinkubiert. Nach dem Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1,3  
5 wurden 100 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactosid hinzugefügt und die Kultur für eine weitere Stunde inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und in Puffer A (50 mM Tris, 300 mM KCl, 0,1 mM MgAc, 1mM β-Mercaptoethanol, 0,4 µg/ml Leupeptin, 0,7 mg/ml Pepstatin, 0,5 mM PMSF, pH 7,9) aufgenommen. Die Zellen wurden mit Ultraschall lysiert, das Lysat zentrifugiert und mit 2 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulenmaterial für 2 h  
10 bei 4°C inkubiert. Das Säulenmaterial wurde in eine Säule gepackt und mit 25 ml Puffer A und anschließend mit 20 ml Puffer B (Puffer A und 10% (v/v) Glycerin, 0,02 % (v/v) Nonidet-P40, ohne Magnesium, pH 6,3) gewaschen. Anschließend wurde das Protein mit 5 ml Puffer C (Puffer B mit 500 mM Imidazol) eluiert. Darauf folgte  
15 eine Dialyse gegen Puffer D (50 mM Tris, 20 mM KCl, 1mM EDTA, 5 mM PMSF, 10% (v/v) Glycerin, 0,02 (v/v) Nonidet-P40, pH 7,9). Die Präparation wurde zentrifugiert und auf eine MonoQ-Säule (1 ml Bettvolumen) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 5 Bettvolumen Puffer mit 50 mM KCl gewaschen und die Säule mit einem Gradienten über 40 Bettvolumen mit einer Endkonzentration von 500 mM KCl eluiert. Die DAN-Aktivität eluierte in einem scharfen Peak bei ca. 190 mM KCl  
20 (Fig. 1A).

Die Reinigung führte zu einer nahezu homogenen Präparation eines Proteins mit der erwarteten molekularen Masse (Fig. 1B und 1C). Das Protein weist eine poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuclease-Aktivität auf (siehe Beispiel 6). Daraus folgt, daß der  
25 gefundene cDNA-Klon für eine humane DAN kodiert.

### 5. Northern-Blot Analyse

RNA wurde aus HeLa-Zellen nach einer Methode von Chomczynski, P. & Sacchi, N.  
30 (1987) Anal. Biochem. 162, 156 isoliert. Poly(A) mRNA wurde mit Hilfe von oligo(dT)-Zellulose nach einer Methode von Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, N.Y., gereinigt. Die resultierende RNA wurde auf einem 1%igen Agarose-Formaldhyd-Gel aufgetrennt, auf eine Hybond N+ Membran von der Fa. Amersham Buchler, Braunschweig durch Kapillar-Blot transferiert und durch Inkubation für 2 h bei 80°C auf der Membran fixiert. Die für die humane DAN kodierende Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert, mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP durch Random-Priming markiert und als Sonde benutzt. Die Hybridisierung wurde wie beschrieben durchgeführt (Ausubel) und die Membran wurde unter hoher Stringenz gewaschen. Die Northern-Blot-Analyse mit poly(A)<sup>+</sup> RNA aus HeLa Zellen zeigte ein einziges 3,1 kB Fragment, das mit der DAN-Probe hybridisierte. Diese Größe stimmt gut mit der Größe des cDNA-Klons überein.

## 6. DAN-Aktivitätstest

Der Assay für die DAN-Aktivität wurde wie beschrieben durchgeführt (Körner, Chr 15 G. & Wahle, E. (1997), supra). SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680 durchgeführt.

Wie das bovine Enzym ist die rekombinante DAN in Abhängigkeit von der Neutralisierung von Phosphatladungen unter zwei verschiedenen Reaktionsbedingungen 20 aktiv. In der Abwesenheit von Salz ist die Aktivität vollständig von der Anwesenheit von Spermidin mit einem Konzentrationsoptimum von 1mM abhängig. Unter diesen Bedingungen ist die spezifische Aktivität der rekombinanten DAN (79.000 U/mg) nicht signifikant unterschiedlich von der Aktivität gereinigter boviner DAN (110.000 U/mg). In der Anwesenheit von Spermidin wird die Aktivität von DAN durch Salz 25 gehemmt. In der Abwesenheit von Spermidin ist die Aktivität des Enzyms mit einem Konzentrationsoptimum von 150 mM Kaliumacetat von Salz abhängig. Bovine DAN verhält sich auch unter diesen Bedingungen ähnlich.. Allerdings ist die spezifische Aktivität des rekombinanten Proteins (960 U/mg) unter diesen Bedingungen geringer, als die des aus Kalbsthymus gereinigten Enzyms (8070 U/mg). Dieser Unterschied ist durch eine posttranskriptionale Modifikation oder durch kontaminierende 30 Proteine in der Präparation des bovinen Enzyms erklärbar.

Wurde eine mit einem Cap versehene, polyadenyierte RNA mit den DAN-Präparationen in der Anwesenheit von Salz inkubiert, wurde der poly(A)-Schwanz degradiert und vollständig deadenyierte RNA vorübergehend accumuliert (Fig. 3). Wurde der Assay in Anwesenheit von PABI durchgeführt, wurde die Aktivität teilweise 5 inhibiert und stufenweiser Abbau des poly(A)-Schwanzes beobachtet. Die vorherrschenden Abbauprodukte differierten in der Länge um ca. 30 Nukleotide, welches offensichtlich durch die PABI-Bindung verursacht wurde. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen für bovinen Protein überein (Körner Chr. & Wahle, E. (1997, supra). Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse, daß das rekombinante 10 Protein eine poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuclease ist.

## 7. Western-Blot Analysen

Western-Blot Analysen wurden wie folgt durchgeführt: Die Proteine wurden mittels 15 SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran mit Hilfe der Semidry-Methode (Kyse-Andersen, 1984) übertragen. Die Blots wurden mit TNT-Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, pH 7,5) mit 5% (w/v) entfetteter Trockenmilch inkubiert. Der gleiche Puffer wurde für die Inkubation mit Antiserum und die Waschschritte verwendet. Die Blots wurden mit den Antikörpern für 2-3 h 20 bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mittels eines Peroxidase-konjugierten Schwein-anti-Kaninchen-Antikörpers (DAKO, Glostrup, Denmark) und Chemiluminiszenz-Färbung (SuperSignal-Kit, Pierce) nachgewiesen.

25 Die Analysen zeigen, daß Kaninchen-Antikörper, die gegen ein C-terminales Fragment von DAN erzeugt wurden, aus teilgereinigten Fraktionen DAN präzipitieren können. Die Antikörper erkennen im Western-Blot sowohl bovinen, als auch humanes DAN (Fig. 4). In diesem Experiment erscheint das rekombinante DAN etwas größer als das Enzym in SDS-Lysaten aus HeLa-Zellen, was durch die Einführung 30 des Tag (1004 Da) in die Sequenz erklärt werden kann. Wenn das erste AUG in der cDNA-Sequenz nicht das benutzte Start-Codon sein sollte, hätte die natürliche DAN aus HeLa-Zellen mindestens 1260 Da größer als das mit einem Tag versehene re-

kombinante Protein sein müssen. Auch diese Ergebnisse bestätigen eine Benutzung der ersten AUG-Sequenz im cDNA-Klon als Start-Codon in vivo.

## Patentansprüche

1. Nukleinsäure kodierend für eine humane deadenylierende Nuclease (DAN) mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei SEQ 11 Teil des Anspruchs ist.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA ist.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ 12 von Position 58 bis 1977 ist, wobei SEQ 12 Teil des Anspruchs ist.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine polyA-Sequenz enthält.
5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten ist.
6. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.
7. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ 11 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren.
8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird.

9. Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 7.
10. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 7 immunisiert und gegebenenfalls die entstandenen Antikörper isoliert werden.
11. Arzneimittel enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 und gegebenenfalls pharmazeutisch annehmbare Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

10

12. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und/oder Diabetis und/oder zur Beeinflussung des Zellmetabolismus, insbesondere bei der Immunsuppression, vor allem bei Transplantationen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 oder Antikörper gemäß Anspruch 9 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Zusatz- und/oder Hilfsstoff formuliert wird.

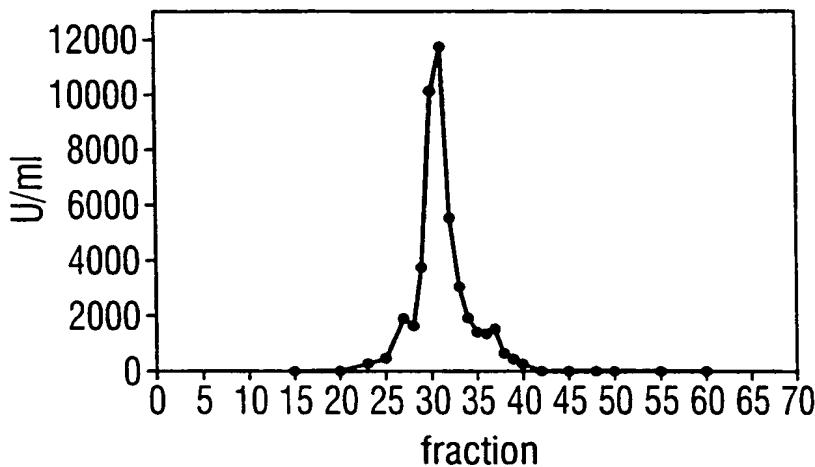
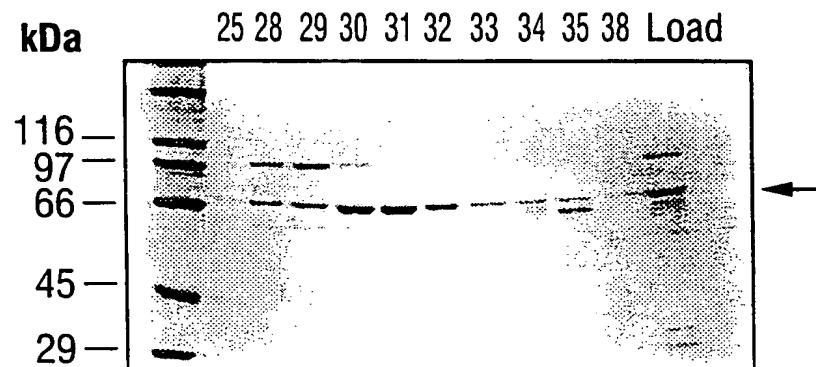
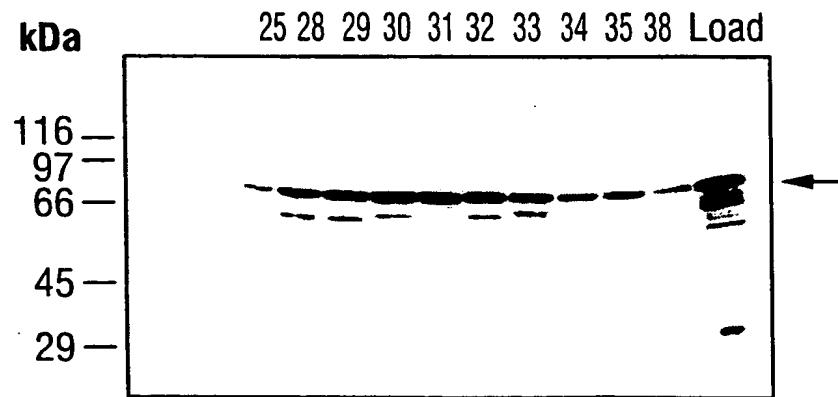
15  
20

13. Diagnostikum enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 oder Antikörper gemäß Anspruch 9 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.
14. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Krebs, Autoimmunkrankheiten, insbesondere Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis, Alzheimer-Krankheit, Allergien, insbesondere Neurodermitis, Typ I Allergien oder Typ IV Allergien, Arthrose, Atherosklerose, Osteoporose, akute und chronische Infektionskrankheiten und/oder Diabetis und/oder zur Analyse des Zellmetabolismus, insbesondere des Immunstatus, vor allem bei Transplantationen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Poly-

peptid gemäß Anspruch 7 oder Antikörper gemäß Anspruch 9 mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger versetzt wird.

15. Test zur Identifizierung von funktionellen Interaktoren enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7 oder Antikörper gemäß Anspruch 9 und gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.  
5
16. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 oder eines Polypeptids gemäß Anspruch 7 zur Identifizierung funktioneller Interaktoren.  
10
17. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-5 zum Auffinden von Varianten der humanen DAN, dadurch gekennzeichnet, daß eine Genbank mit der genannten Nukleinsäure abgesucht und die gefundene Variante isoliert wird.  
15
18. Verwendung eines Polypeptids gemäß Anspruch 7 zum poly(A)-spezifischem Abbau von Nukleinsäuren, insbesondere von mRNA.

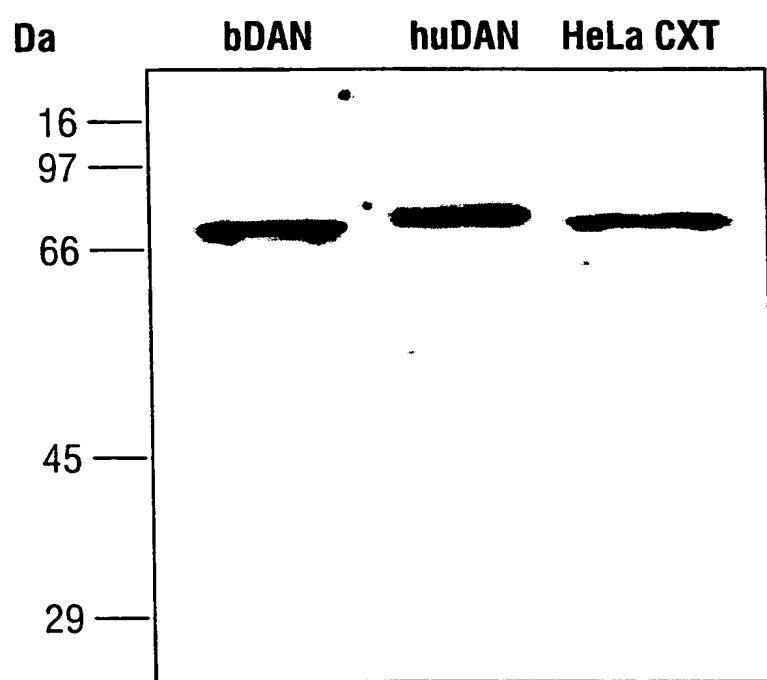
1 / 4

**Fig. 1A****Fig. 1B****Fig. 1C**



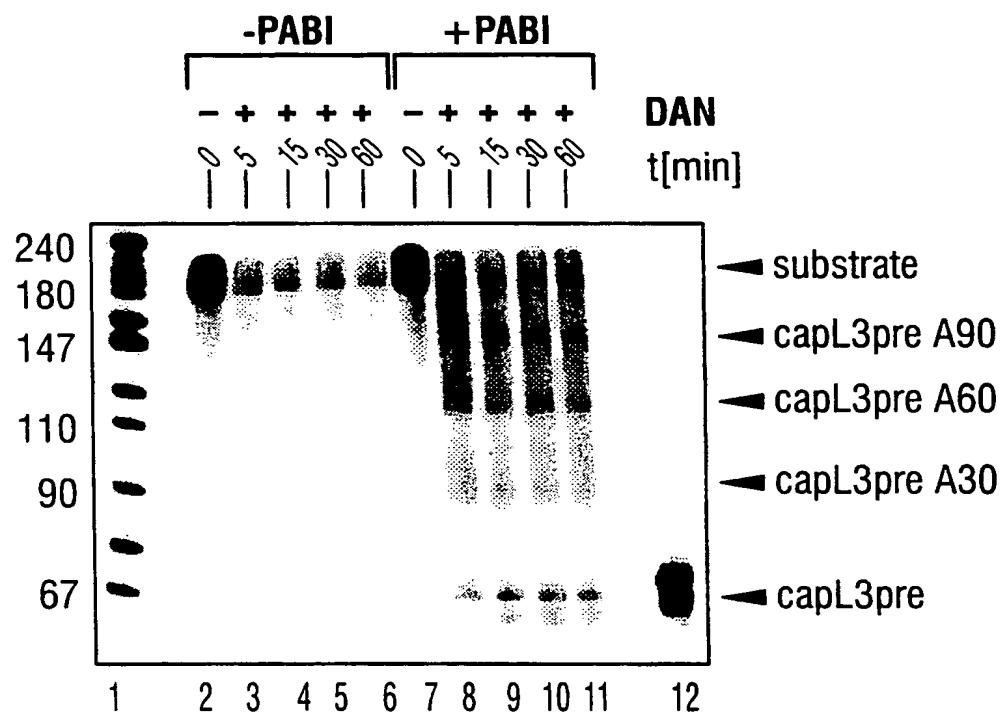
2 / 4

**Fig. 2**





3 / 4

***Fig. 3***



***Fig. 4.***

huDAN	22	A	D	F	F	A	I	<b>D</b>	G	E	F	S	G	I	S	35
K10C81	23	C	D	F	V	A	I	<b>D</b>	F	E	F	L	G	L	D	36
A. thaliana								<b>D</b>				M	T	G	V	T
PAN2	904	G	T	L	V	A	I	<b>D</b>	A	E	F	V	S	L	Q	917
RNaseD	22	F	P	A	I	A	L	<b>D</b>	T	E	F	V	R	T	R	35
EcoDNAPol1	349	A	P	V	F	A	F	<b>D</b>	T	T	T	D	S	L	D	362

↑                   ↑  
ExoI

huDAN	283	L	V	I	G	H	N	M	L	L	<b>D</b>	V	M	H	T	V	H	298
K10C81	284	L	V	V	G	H	N	S	L	L	<b>D</b>	A	M	Y	M	Y	H	299
A. thaliana											<b>D</b>	I	A	H	V	Y	S	
PAN2	1011	V	F	V	G	H	G	L	N	N	<b>D</b>	F	K	H	I	N	I	1026
RNaseD	76	T	K	F	L	H	A	G	S	E	<b>D</b>	L	E	V	F	L	N	91
EcoDNAPol1	415	L	K	V	G	Q	N	L	K	Y	<b>D</b>	R	G	I	L	A	N	430

↑  
ExoII

huDAN	373	S	E	Q	L	<b>H</b>	E	A	G	Y	<b>D</b>	A	Y	I	T	G	L	C	389
K10C81	370	E	N	V	Y	<b>H</b>	N	A	G	F	<b>D</b>	S	Y	V	T	G	E	V	376
A. thaliana						<b>H</b>	E	A	G	Y	<b>D</b>	A	F	M	T	G	C	I	
PAN2	1062	Q	E	G	N	<b>H</b>	D	S	I	E	<b>D</b>	A	H	T	A	L	I	L	1078
RNaseD	146	E	R	Q	E	W	<b>Y</b>	A	A	A	<b>D</b>	V	W	Y	L	L	P	I	162
EcoDNAPol1	493	E	E	A	G	R	<b>H</b>	A	A	E	<b>D</b>	A	D	V	T	L	Q	L	507

↑                   ↑  
ExoIII



1  
SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG
- (B) STRASSE:
- (C) ORT: 65926 Frankfurt
- (D) BUNDESLAND:
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 65926

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Humane deadenylierende Nuclease, ihre Herstellung und Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 29

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: WINDOWS 3.1

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1

KSFNFYVFPK

10



## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2

KPFNRSSPDV K

11

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3

KPFNRSSPDK K

11

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 16
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4

KYAESYWIQT YADYVG

16



3

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5

KEQEELNDA

8

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6

KLFLMRVMD

9

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: Primer-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7

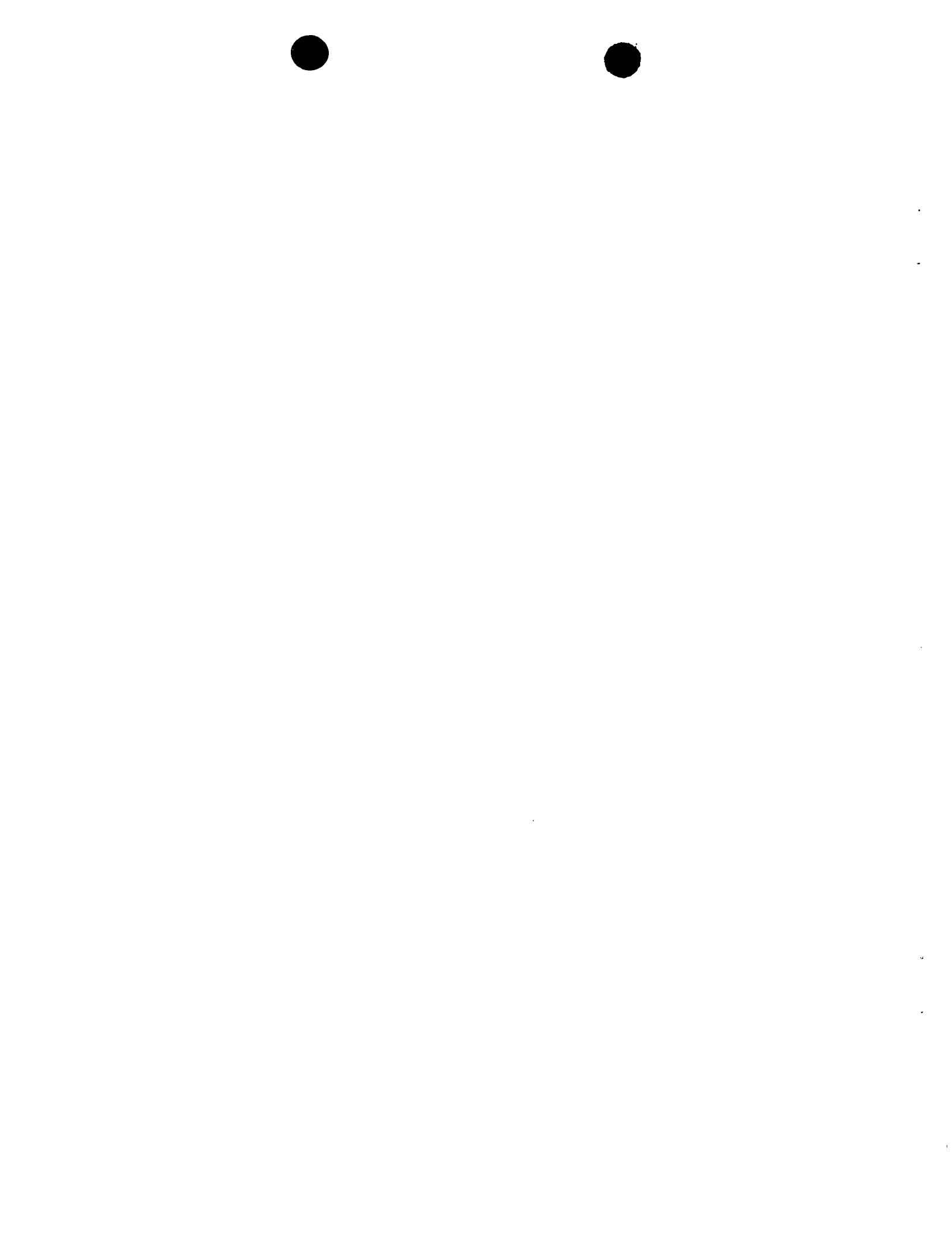
CCATATCCAT ATGCTTTCA GTGCCTTC TAAC

34

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear



(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: Primer-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8

AGTACTCGAG TTACAATGTG TCAGG

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: Primer-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9

AGTGTCGCAT ATGGAGATAA TCAGGAGCA

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nucleinsäure: Primer-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10

AGTACTCAGC GGTTTGCTGC CCTCA

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 639
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus



## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11

MEIIRSNFKS	NLHKVYQIAIE EADFFAIDGE FSGISDGPSV SALTNGFDTP EERYQKLKKH	60
SMDFLLFQFG	LCTFKYDYTD SKYITKSFNF YVFPKPFNRS SPDVKFVCQS SSIDFLASQG	120
FDFNKVFRNG	IPYLNQEER QLREQYDEKR SQANGACALS YVSPNTSKCP VTIPEDQKKF	180
IDQVVEKIED	LLQSEENKNL DLEPCTGFQR KLIYQTLSWK YPKGIHVETL ETEKKERYIV	240
ISKVDEEERK	RREQQKHAKE QEELNDAVGF SRVIHAIANS GKLVIGHNML LDVMHTVHQF	300
YCPLPADLSE	FKEMTTCVFP RLLDTKLMAS TQPFKDIINN TSLAELEKRL KETPFNPPKV	360
ESAEGFPSYD	TASEQLHEAG YDAYITGLCF ISMANYLGSF LSPPKIHVSA RSKLIEPFFN	420
KLFLMRVMDI	PYLNLEGPDL QPKRDHVHLV TFPKEWKTSD LYQLFSAFGN IQISWIDDTS	480
AFVSLSQPEQ	VKIAVNNTSKY AESYRIQTYA EYMGRAKQEEK QIKRKWTEDS WKEADSKRLN	540
PQCIPYTLQN	HYYRNNSFTA PSTVGKRNLPS PQSEEAGLED GVSGEISDTE LEQTDSCAEP	600
LSEGRKKAKK	LKRMKKEKSP AGSISKNSPA TLFEVPTW	639

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2941
- (B) ART: Nucleotidsequenz
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: c-DNA zu m-RNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12

GAACCGCTGA	GGCGGGCGCG	GGCCCGGGTG	GGGCCAAGGT	TCCGGCCACT	CTGCAGAATG	60
GAGATAATCA	GGAGCAATT	TAAGAGTAAT	CTTCACAAAG	TGTACCAGGC	CATAGAGGAG	120
GCCGACTTCT	TCGCCATCGA	TGGGGAGTT	TCAGGAATCA	GTGATGGACC	TTCAGTCTCT	180
GCATTAACAA	ATGGTTTG	CACTCCAGAA	GAGAGGTATC	AGAACGTTAA	AAAGCATTCC	240
ATGGACTTTT	TGCTATTCA	GTTGGCCTT	TGCACTTTA	AGTATGACTA	CACAGATTCA	300
AAGTATATAA	CGAACGTATT	TAACTTCTAT	GTTTCCCCGA	AACCCTTCAA	TAGATCCTCA	360
CCAGATGTCA	AATTGTTTG	TCAGAGCTCC	AGCATTGACT	TTCTAGCAAG	CCAGGGATT	420
GATTTAATA	AAGTTTTCG	AAATGGAATT	CCATATTAA	ATCAGGAAGA	AGAAAGACAG	480
TTAAGAGAGC	AGTATGATGA	AAAACGTTCA	CAGGCGAATG	GTGCAGGAGC	TCTGCTTAT	540
GTATCTCTA	ACACTTCAAA	ATGTCCTGTC	ACGATTCTG	AGGATCAAAA	GAAGTTTATT	600
GACCAAGTGG	TAGAGAAAAT	AGAGGATT	TTACAAAGTG	AAGAAAACAA	GAACCTGGAT	660
TTAGAGCCAT	GTACCGGGTT	CCAAAGAAAA	CTAATTATC	AGACTTTGAG	CTGGAAGTAT	720
CCGAAAGGCA	TTCATGTTGA	GA	ACTTTAGAA	ACTGAAAAGA	AGGAGCGATA	780
AGCAAAGTAG	ATGAAGAAGA	ACGAAAAGA	AGAGAGCAGC	AGAAACATGC	CAAAGAACAG	840
GAGGAGCTGA	ATGATGCTGT	GGGATTTCT	AGAGTCATT	ACGCCATTGC	TAATTGGGA	900
AAACTTGT	TTGGACACAA	TATGCTCTTG	GACGTATGC	ACACAGTTCA	TCAGTTCTAC	960
TGCCCTCTGC	CTGCGGACTT	AAAGTGAGTT	AAAGAGATGA	CAACATGTGT	TTTCCCCAGA	1020
CTCTTGGATA	CTAAATTGAT	GGCCAGCACA	CAACCTTTA	AGGATATCAT	TAACAACACA	1080
TCCCTTGC	AATTGGAAAA	GCGGTTAAAA	GAGACACCTT	TCAACCCCTCC	TAAAGTTGAA	1140
AGTGGCGAAG	GT	TTATGACACA	GCCTCTGAAC	AACTCCACGA	GGCAGGCTAC	1200
GATGCCCTACA	TCACAGGGCT	GTGCTTCATC	TCCATGGCCA	ATTACCTAGG	TTCTTTCTC	1260
AGCCCTCCAA	AAATTCTATGT	GTCTGCCAGA	TCAAAACTCA	TTGAACCTT	TTTAACAAG	1320
TTATTTCTTA	TGAGGGTCAT	GGATATCCCC	TATCTAAACT	TGGAAGGACC	AGACTTGCA	1380
CCTAAACGTG	ATCATGTTCT	CCATGTGACA	TTCCCCAAAG	AATGGAAAAC	CAGCGACCTT	1440
TACCAGCTT	TCAGTGCCTT	TGGTAACATT	CAGATATCCT	GGATTGATGA	CACATCAGCA	1500
TTTGTTC	TTAGCCAGCC	CGAGCAAGTA	AAGATTGCTG	TCAATACCA	CAAATATGCA	1560
GAAAGCTATC	GGATCCAAAC	CTATGCTGAA	TATATGGGA	GAAAACAGGA	AGAGAACAG	1620
ATCAAAAGAA	AGTGGACTGA	AGATAGCTGG	AAGGAGGCTG	ACAGCAAACG	GTTAAACCCC	1680



CAGTGCATAAC	CCTACACCCCT	GCAGAATCAC	TATTACCGCA	ACAATAGTTT	TACAGCTCCC	1740
AGCACAGTAG	GAAAGAGAAA	TTTGAGTCCT	AGTCAGAGG	AAGCTGGCCT	GGAGGACGGA	1800
GTGTCAGGGG	AGATTTCCGA	CACTGAGCTT	GAGCAGACCG	ATTCCTGTGC	AGAGCCCCTC	1860
TCAGAGGGAA	GGAAAAAGGC	CAAGAAATTA	AAAAGAATGA	AGAAGGAGCT	TTCTCCAGCA	1920
GGAAGCATCT	CGAAGAACAG	CCCTGCCACA	CTCTTGAAG	TTCTGTACAC	ATGGTAAACCA	1980
AGACCTGAGG	GCAGCAAACC	GCTGGTGTG	TCGCTGTGAG	CAAGAGCCGG	CTGGCACATT	2040
TGGAAGCCGC	ACTGTATTTA	ACTTAATCAA	ATGTGGTATG	GGAGGGGTTG	GAAACCAAGT	2100
TGTCTCCTGG	GGGGGAGAAA	ACAGGTTTTA	TTTTGTGGC	TGTGGTTTT	TCCCCTTTTT	2160
AATCTAAGT	CCTGTTGACA	TTGACACTCA	TCACGGTTGT	AGGCTGTCA	GAATGTGTAC	2220
GTGCTTAACC	AGTGAATTCC	GTGTTGCTCT	TGTGAGGCCT	TTCTGTCA	GACCCAGTGT	2280
GCTTAAGAAC	CTGCTGTATG	GGGAGTGTG	GCTGTGAAAT	CTGCAAAAG	AGCTGACATT	2340
CCAGCTGCTG	TGATCATGAA	TTTGGGGGTG	TACTGTCTG	CCTGTGCATC	TTCTCGCACT	2400
GAGATTTGA	GGCAGTTGCA	GCCCTCGGTT	AGTCTCCCAG	TGGAAAATC	GGTTGTGCCT	2460
CCCTGTTCC	CACCATAGCT	GCCTGAAAAC	ATGACGCTCT	CAAGCTTGTG	CTTCCCTTCAG	2520
GAAGATGTCC	ACTCATGCC	ACCCATGAGA	GGGCTTGC	TATGCCCTGG	CCTTTGGGCA	2580
TATTATGTA	GAGTTCTTT	CTCCTAAGAC	GTGAGTTCT	CATGGGGGAT	GTACGAGTAA	2640
AAAGGTTAAC	TTCTGTTCTT	ATGCGTGGCG	CTGTGTTCA	TTTCCAGAGT	CTCTGTTCGT	2700
TTGTTTGGAT	GGCGGTCTCG	GGGTACGGCA	GGGTGTGTG	GTACGTGTCT	GTGTGTGTGT	2760
GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGA	AATCGTCAA	ATCTACAACA	TGTCCCAGCC	2820
CATTCTCCGT	TGAAACAGAT	CACAGCAACG	ACAAACGCTC	ATGGCGCTGC	TTTGTCCAC	2880
CCGCTTCAGA	TAGATCATTG	TTAGATATT	CACATTTTG	TATGGTGGAA	ATAAAAATGA	2940
AAAATGTATT	TCCAAAAGAT	GAAAATTAAA	AACATTTCA	TAGGAAAAAA	AAAAAAAAAA	3000
AA						2

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 12
  - (B) ART: Aminosäuresequenz
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13

ADFFAIGFSG IS

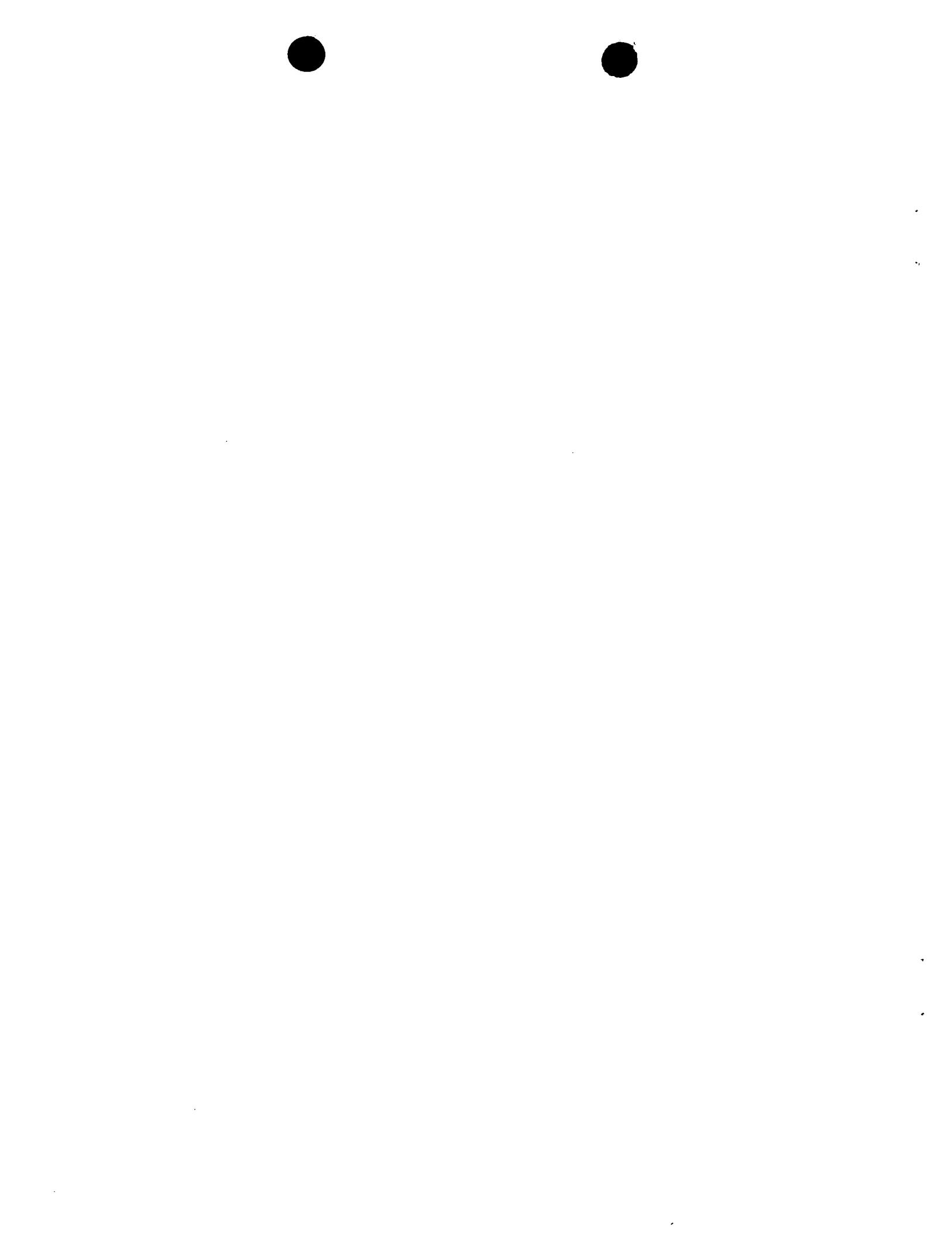
12

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 15
  - (B) ART: Aminosäuresequenz
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment



(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13

LVIGHNMLLV MHTVH

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 16
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14

SEQLHEAGYA YITGLC

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15

CDFVAIFFLG LD

12

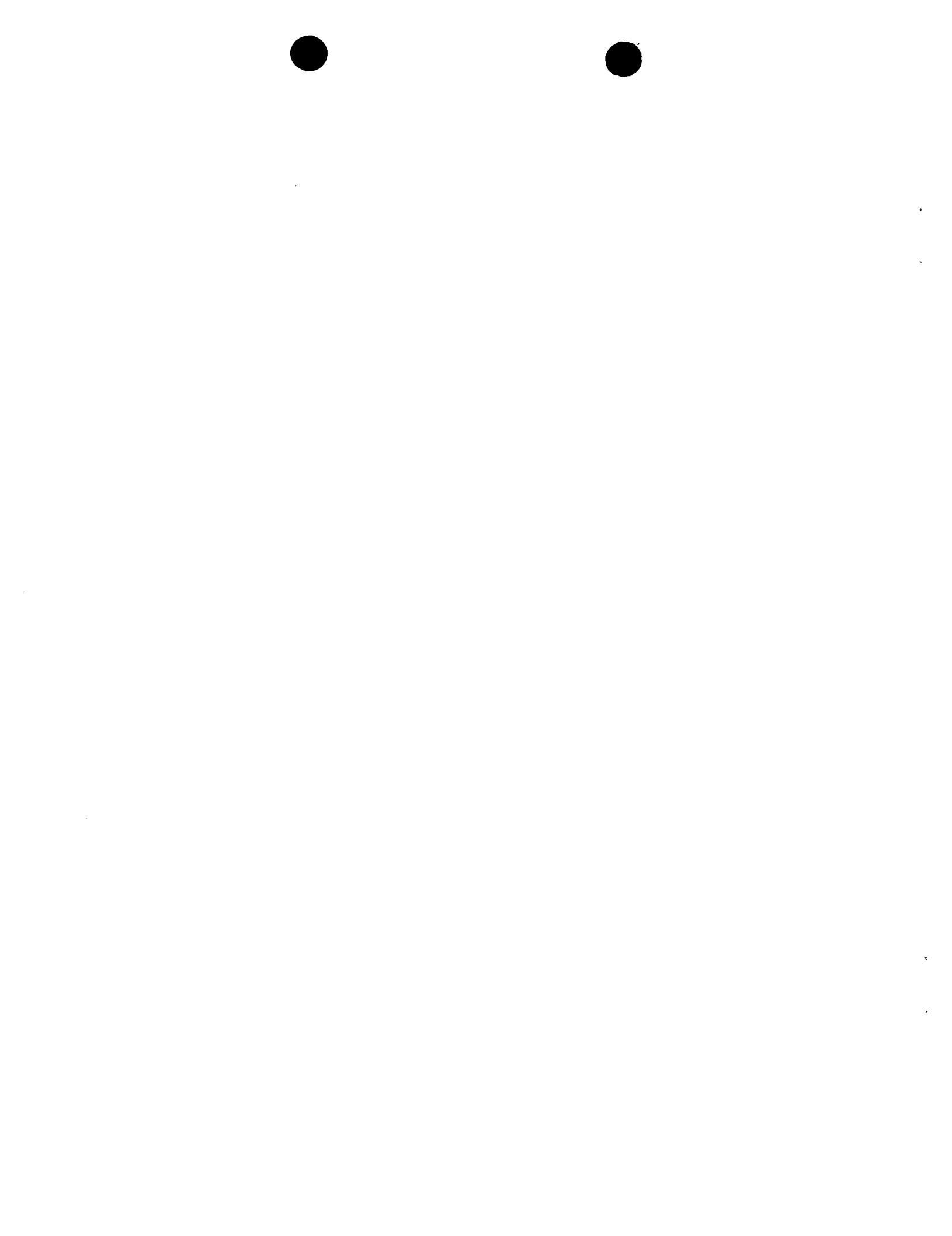
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment



(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16

LVVGHNSLLA MYMYH

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 16
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17

ENVYHNAGFS YVTGEV

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18

ADFVAILMTG VT

12

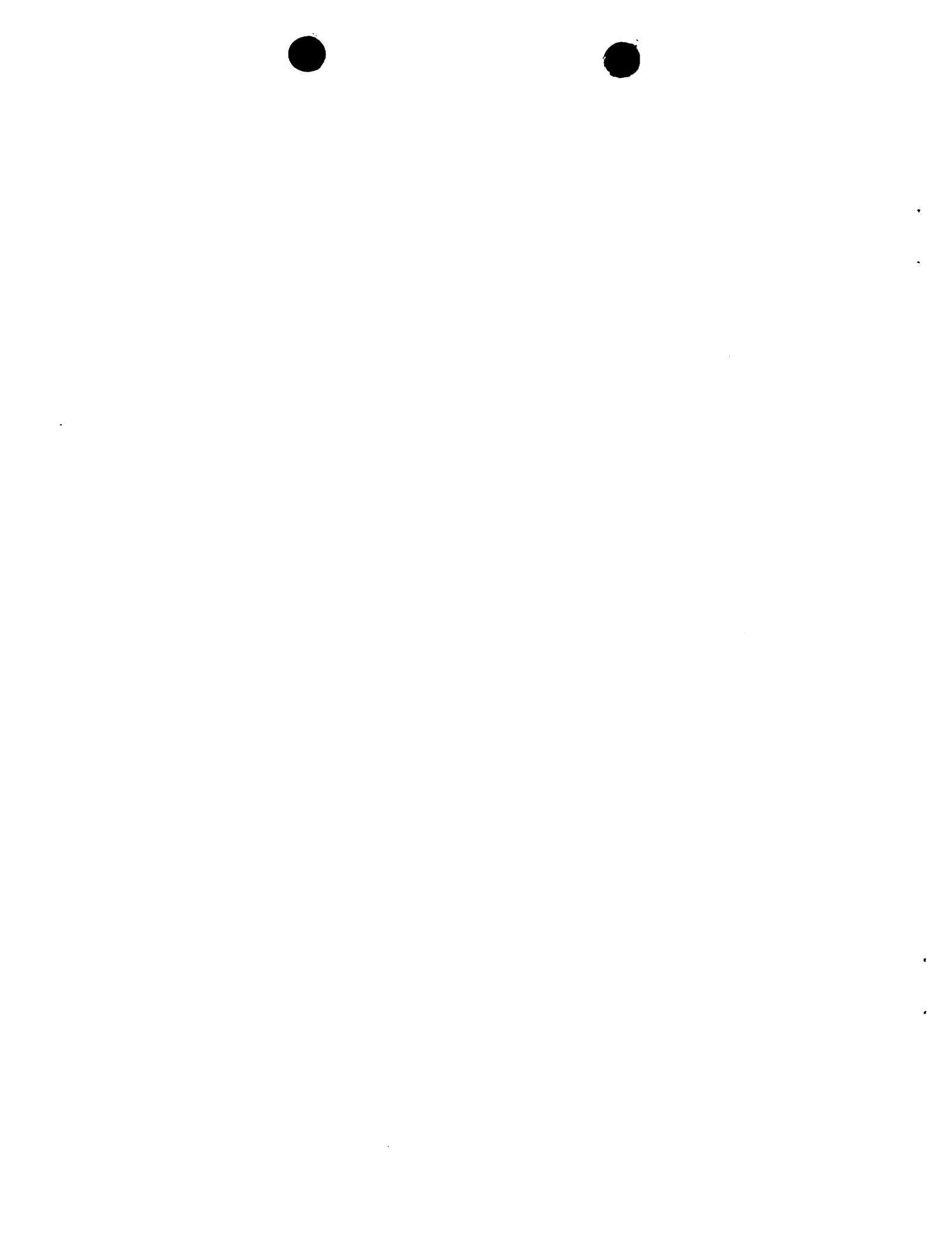
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment



(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19

LIVGHNCFLI AHVYS

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 16
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20

AGGKHEAGYA FMTGCI

16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20

GTLVAIAFVS LQ

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

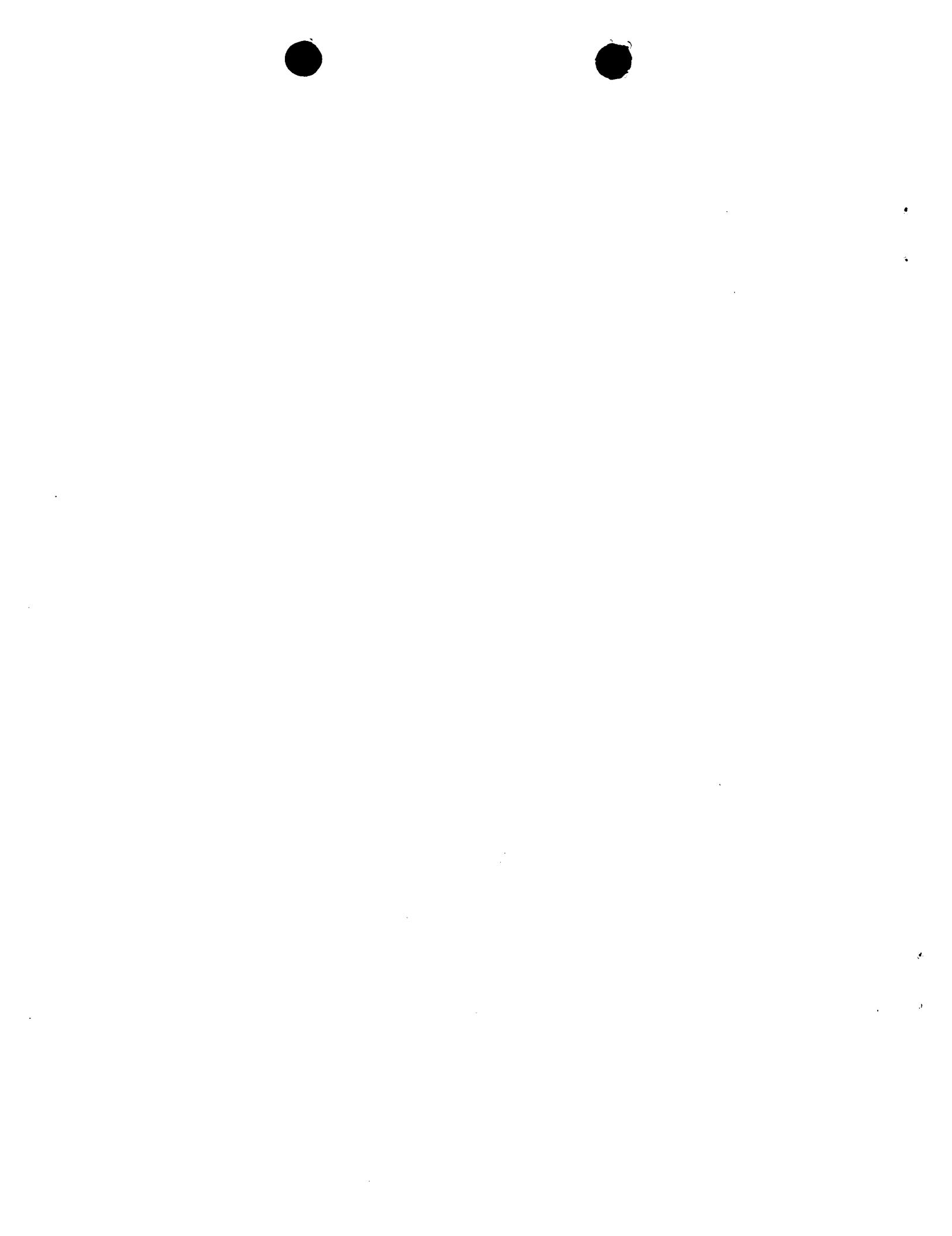
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22

VFVGHGLNNF KHINI

15



10

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 16
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23

QEGNHDSIEA HTALIL

16

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24

FPAIALTFVR TR

12

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25

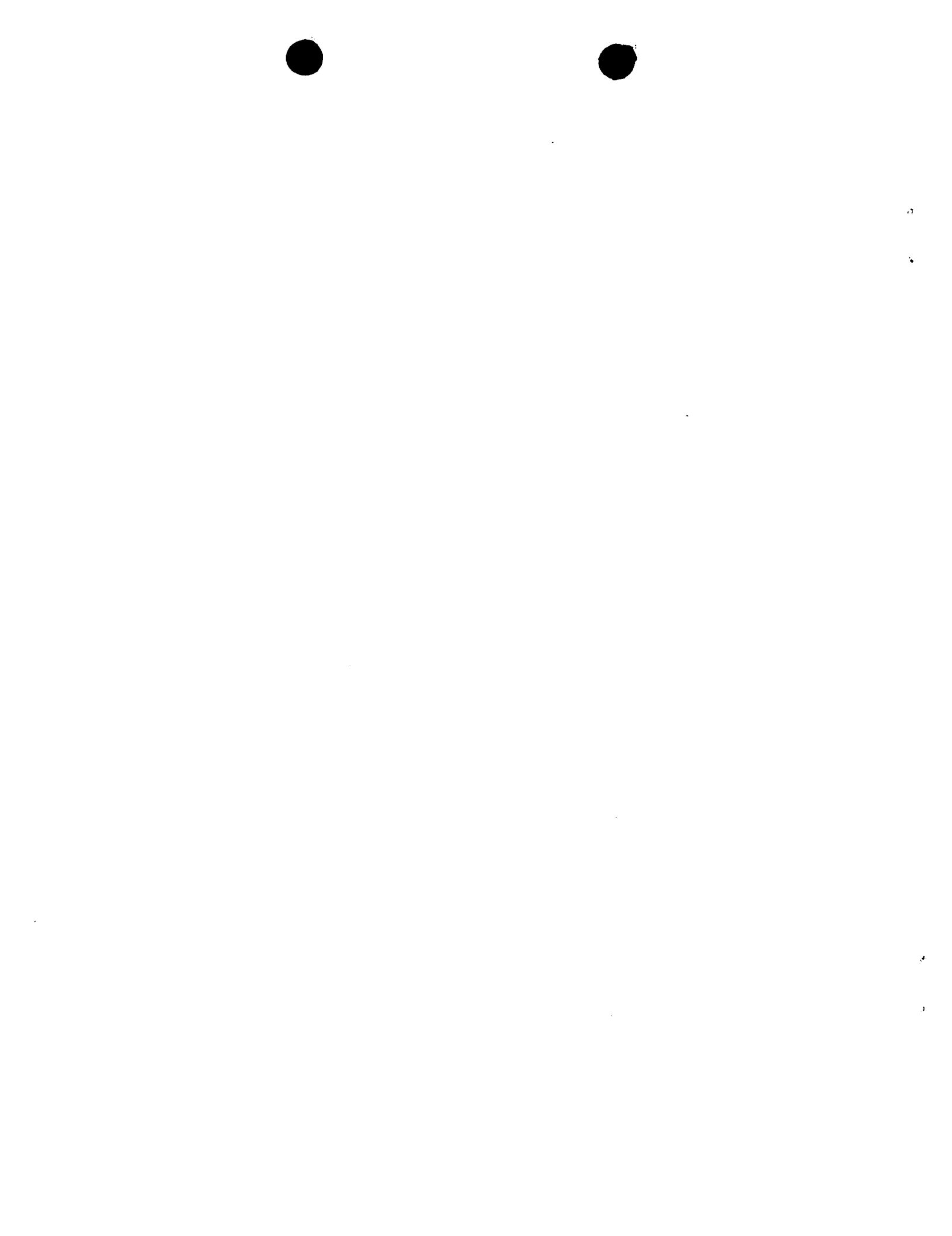
TKFLHAGSEL EVFLN

15

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15



11

- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26

ERQEWA  
AAVW YLLPI

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27

APVFAFTTDS LD

12

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28

LKVGQNLKYR GILAN

15



12

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 15
- (B) ART: Aminosäuresequenz
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29

EEAGRAAEAAD VTLQL

15

THIS PAGE BLANK (USPTO)